

EFEK KEMOPREVENTIF DAN ANTIHEMATOTOKSIK MINYAK BIJI JINTEN HITAM (MBJH)

CHEMOPREVENTIVE AND ANTIHEMATOTOXICITY EFFECT OF BLACK CUMINE SEED OIL (BCSO)

Akrom¹, Mustofa², Marstyawan², Mubarika²

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta¹,
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta²
Email: akmaa_uad@yahoo.co.id

ABSTRAK

Senyawa 7,12-DMBA-3,4-diol-1,2 epoksida (DMBA-DE) disamping bersifat karsinogenik juga terbukti menekan aktivitas sumsum tulang dan spleenosit sehingga diduga dapat menurunkan jumlah netrofil, monosit dan limfosit darah tepi. Biji jinten hitam (BJH) secara empiris telah digunakan sebagai komponen jamu dengan berbagai macam indikasi, namun mekanisme kerja kandungan zat aktif BJH belum semua diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian 0,25, 2,5 dan 5 ml/kgbb/hari MBJH selama dan sebelum induksi 10x20 mg/kgbb DMBA terhadap persentase monosit & netrofil darah tepi tikus Sprague dauley. Pada penelitian ini digunakan 80 ekor tikus SD. Hewan uji dibagi dalam 8 kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor. Kelompok I (kontrol normal) diberi akuabides dan makanan standar, kelompok II, III dan IV sebagai kelompok perlakuan dengan pemberian MBJH 0.25, 2.5 dan 5 ml/kgbb/hari dan diinduksi DMBA. Kelompok V dan VI sebagai kontrol positif I (diberi timokuinon 50 mg/kgBB) dan sebagai kontrol II (diberi tamoksifen). Kelompok VII sebagai kelompok sakit hanya diinduksi DMBA 10x20mg/kgbb selama 5 pekan. Pada minggu ketiga kelompok I- VII mulai diinduksi dengan 20 mg/kgBB DMBA, 2x/pekan selama lima pekan. Kelompok VIII sebagai kelompok kontrol pelarut, hewan uji mendapatkan makan minum standar dan larutan minyak jagung yang diberikan sebagaimana pemberian DMBA. Dilakukan analisis statistik perbedaan rata-rata antar kelompok dengan ANAVA dan post hoc dengan tingkat kepercayaan $p < 0,05$ untuk persentase komponen lekosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MBJH bersifat kemopreventif dan hematoprotektor. Pada kelompok yang mendapatkan MMBJH memiliki persentase jumlah monosit, netrofil dan limfosit lebih tinggi dari kelompok DMBA. Persentase limfosit, netrofil, dan monosit kelompok MBJH setara dengan kelompok timokuinon ($p > 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa MBJH terbukti bersifat kemopreventif dan dapat berlaku sebagai hematoprotektor terhadap karsinogen DMBA.

Kata kunci: immunoprotective; kemopreventif; limfosit; monosit; netrofil, maserat heksan biji jinten hitam.

ABSTRACT

Compound 7,12-DMBA-3,4-diol-1,2-epoxide (DMBA-DE) has been shown to suppress the activity of the bone marrow and spleenosit, supposedly to be able to reduce production and cell activity of peripheral blood monocytes and neutrophils. This study aimed to determine the effects of 0.25, 2.5 and 5 ml/kg BW/day black cumin seeds oil (BCSO) during and prior to percentage of monocyte and neutrophil blood Sprague dauley rats. In this study used 80 Sprague dauley rats. Animals used in these tests were divided into 8 groups, each consisting of 10 individuals. Group I (normal control) was given aquabides and food standards, group II, III and IV as the treatment group were given MHBHJH 0.25, 2.5 and 5 ml/kg bw/ day and induced DMBA. Group V and VI as a positive control I (given timokuinon 50 mg / kg BW) and positive control II (tamoxifen). Group VII were used negative control group, was induced DMBA 10x20mg/kgBW for 5 weeks. In the third week, I – VII groups started induced with 20 mg/kg BW DMBA, 2x/weeks for five weeks. Group VIII was as the solvent control group, the test animals just get standard fed and drink and given corn oil solution as DMBA administration. Mean difference between groups of monocytes, neutrophils and lymphocytes percentage were analyzed with ANOVA and post hoc. The results showed that BCSO been chemopreventive and hematoprotector. The percentages of monocytes, neutrophils and lymphocytes in the BCSO groups were higher than in the DMBA group. The percentage of lymphocytes, neutrophils, and monocytes in the BCSO groups were equivalent with the thimoquinone group ($p > 0.05$). The scientific evidence of BSCO as chemopreventive and hematoprotector effects had been clearer. It could be concluded that the BCSO be chemopreventive antihematotoxic agent.

Keywords: immunoprotective; chemopreventive; lymphocytes; monocytes; neutrophils, maserat hexane black cumin seeds.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan masalah kesehatan masyarakat, dengan morbiditas dan mortalitas yang semakin meningkat (Tjindarbumi and Mangunkusumo, 2002). Salah satu faktor yang terlibat dalam peningkatan insidensi kanker payudara di Indonesia adalah tingginya tingkat polusi udara oleh berbagai bahan karsinogen, antara lain asap kendaraan bermotor, asap dari industri, asap rumah tangga maupun dari rokok (Purnamasari et

al., 2005). Asap rokok, asap dapur dan asap kendaraan bermotor banyak mengandung senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon yang bersifat karsinogenik, salah satunya adalah 7,12 dimethylbenzanthracena (DMBA) (Hodgson et al., 2001). Selain bersifat genotoksik karsinogen DMBA juga terbukti bersifat imunotoksik dan hematotoksik (Gao et al., 2005; Melendez-colon et al., 1999; 2000).

Kelemahan sistem imun merupakan salah satu faktor yang mempercepat perkembangan neoplasma menjadi kanker (Roit, 2006; Gibbs, 2000). Salah satu komponen imunitas seluler adalah monosit, netrofil dan limfosit (Abbas, 2004; Kresno, 2001). Dalam tubuh DMBA dimetabolisir oleh enzim sitokrom dan epoksid hidrolase mikrosomal (Kubatka *et al.*, 2002) menjadi karsinogen ultimat 7,12-dimetilbenzantrasen-3,4-diol-1,2, diepoksida (DMBA-DE) (Shimada *et al.*, 2001; 2006) yang bersifat genotoksik dan imunotoksik (Gao *et al.*, 2005;2007; 2008; Bajak, 2005). Karsinogen ultimat DMBA-DE disamping menginisiasi karsinogenesis pada jaringan mammae (Miyata *et al.*, 1999; Pitot *et al.*, 2001) terbukti juga menekan aktivitas sistem imun termasuk aktifitas sumsum tulang dan limpa (Gao *et al.*, 2005; 2007; 2008) sehingga menghambat eritropoesis dan pembentukan limfosit, monosit dan netrofil. Page *et al.* (2003) membuktikan bahwa ketoksikan DMBA pada sumsum tulang bergantung p53. Berkurangnya jumlah monosit, netrofil dan limfosit akibat paparan DMBA-DE memperlaju proses karsinogenesis pada hewan uji yang terpapar DMBA (Abbas, 2004; Baratawidjaya, 2004).

Usaha penyembuhan kanker yang sangat sulit mendorong ditemukannya senyawa

kemopreventif maupun agen imunomodulator yang dapat digunakan untuk menghambat atau menolak karsinogenesis akibat paparan karsinogen (Surh *et al.*, 2003; Singletary *et al.*, 2003; el Azizi, 2005). Secara empiris dan laboratorik biji jinten hita (BJH) bersifat kemoprefentif (Muhtasib *et al.*, 2006; Randhawa and Ghomdi, 2002) maupun sebagai imunomodulator (Akrom, 2011; Akrom *et al.*, 2008; Hidayati & Akrom, 2006). Orang Arab, Afrika utara, asia tengah dan Turki secara turun-temurun memanfaatkan biji jinten hitam untuk meningkatkan daya tahan tubuh dan perbaikan stamina (Badary *et al.*, 2007; Farrah *et.al.*, 2004; Al Ghamdi *et al.*, 2001; Sangat, 2000, el Kadi, 1985). Pemberian ekstrak etanol BJH terbukti meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag pada hewan uji mencit yang diinfeksi *Lysteria monocytogenes* (Akrom *et al.*, 2007). Respon imun hospes terhadap karsinogenesis merupakan mekanisme yang komplek dan sayangnya sampai saat ini belum banyak dikaji, terlebih bila dikaitkan dengan imunogen dari tanaman yang mempunyai potensi sebagai imunomodulator dan juga sebagai antikanker (Abbas, 2004; Baratawidjaya, 2004). Bagaimana pengaruh pemberian MBJH terhadap jumlah limfosit, monosit dan netrofil serta karsinogenesis pada tikus SD yang diinduksi DMBA belum

dilakukan. Mengingat bahwa minyak lemak tak jenuh dan timokuinon yang merupakan zat aktif utama MBJH merupakan senyawa potensial sebagai kemoprefentif antioksidan dan imunomodulator yang berpengaruh langsung pada sistem pembentukan sel darah dan karsinogenesis maka penelitian ini sangat penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental acak dengan kelompok kontrol pada hewan uji tikus Sprague dauley betina yang berumur 3-4 minggu dengan berat berkisar 100 – 140 gram diperoleh dari laboratorium Ilmu Hayati UGM (Akrom *et al.*, 2008). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak biji jinten hitam yang dibuat di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, timokuinon (Sigma) dan medium tumbuh.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini inkubator CO₂, sentrifuge, *microplate reader*, *inverted microscope*, seperangkat alat narkose, *laminar air flow hood*, timbangan, dan satu set alat hematology analyzer untuk menghitung jumlah netrofil, monosit dan limfosit.

Prosedur kerja penelitian adalah sbb:

1. Standarisasi sediaan MBJH dengan timokuinon.

Standarisasi minyak *N.sativa* dengan timokuinon dilakukan dengan metode KLT-densitometri (Akrom *et al.*, 2007). Parameter yang diukur pada standarisasi minyak *N.sativa* adalah persen berat kadar timokuinon/ml minyak. Prosedur standarisasi minyak *N.sativa* sebagai kemopreventif adalah sebagaimana dijelaskan peneliti sebelumnya (Meiyanto, 2004b).

2. Uji efek kemoprefentif MBJH pada tikus terinduksi DMBA

Persiapan dan pengelompokan subyek uji

Selama penelitian tikus ditimbang setiap minggunya untuk mengetahui perkembangan berat badan. Hewan uji setelah berumur tiga minggu secara acak dibagi menjadi 8 kelompok, masing-masing kelompok 10 ekor. Kelompok I sebagai kelompok normal, hewan uji pada kelompok ini mendapatkan makan minum standar selama dalam pengujian. Kelompok II, III dan IV merupakan kelompok perlakuan, disamping mendapatkan diet standar +induksi DMBA, hewan uji mendapatkan tambahan pemberian sediaan MBJH terstandart dosis 0,25, 2,5 dan 5 ml/kgBB/hari selama 14 hari sebelum diinduksi dan selama diinduksi DMBA. Kelompok V sebagai kontrol positif 1 (timokinon), hewan uji disamping mendapatkan diet standar+induksi

DMBA, juga mendapatkan tambahan timokuinon 50 mg/kgbb. Kelompok VI sebagai kelompok kontrol positif 2 (tamoksifen), hewan uji disamping mendapatkan diet standar + induksi DMBA, juga mendapatkan tambahan pemberian tamoksifen 1x60 mg/kgbb/hari per oral sebelum diinduksi dan selama diinduksi DMBA. Kelompok VII dan kelompok VIII, merupakan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol pelarut, hewan uji mendapatkan diet standar + induksi DMBA untuk kelompok VII dan mendapatkan diet standar + induksi DMBA dan tambahan pemberian minyak jagung. Induksi 10x20 mg/kgbb DMBA diberikan selama 5 minggu, 2x/minggu per oral.

b. Pembuatan model kanker payudara pada tikus.

Tikus berumur 6 minggu diberi larutan

DMBA dalam minyak jagung dengan dosis 20 mg/kgBB secara peroral. Inisiasi DMBA diulang sebanyak 10 kali dengan frekuensi pemberian 2 kali setiap minggu. (Kubatka *et al.*, 2002). Pemeriksaan terhadap insidensi terbentuknya nodul tumor pada payudara dilakukan secara palpasi sejak pemberian induksi DMBA terakhir, yaitu hewan uji berumur 10 minggu dan dilanjutkan sampai hewan uji berumur 16 minggu. Terabanya nodul tumor pada kelenjar pertama kali pemeriksaan dianggap sebagai insidensi *nodul formation*.

Disamping dilakukan pemeriksaan terhadap insidensi nodul formation juga dilakukan pemeriksaan *nodul multiplication* yaitu banyaknya nodul yang terbentuk pada tiap hewan uji. Insidensi adalah prosentase dari jumlah tikus yang mengandung tumor pada satu kelompok. Adapun *tumour multiplicity* adalah rerata jumlah nodul tumor pada setiap tikus dalam satu kelompok (Akrom *et al.*, 2008).

3. Pemeriksaan darah tepi, Jumlah dan persentase limfosit, Monosit dan Netrofil

Perhitungan jumlah dan jenis leukosit dilakukan secara spektroskopi dengan menggunakan alat *hematology analyzer* dengan prosedur sesuai yang disarankan dari industri pembuat, sebagaimana dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Akrom *et al.*, 2008; Akrom, 2004). Operasionalisasi alat dilakukan oleh tenaga terlatih di LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4. Analisis data

Analisis hasil penelitian secara statistik digunakan metode yang berbeda untuk jenis data yang berbeda. Data jumlah tikus yang mengandung tumor payudara (insidensi) dianalisa dengan metode *survival analisis* Kaplan Meier (Program GraphPad Prism ver 4), data perkembangan berat badan dianalisa dengan Anava dilanjutkan uji Tukey, sedangkan jumlah nodul masing masing tikus (*tumour multiplicity*) antar kelompok

dianalisis dengan uji statistik Non Parametrik Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan Man Whitney Test. Perbedaan rata-rata persentase jumlah limfosit, monosit dan netrofil antar dan inter kelompok ditetapkan dengan uji anava dilanjutkan uji LSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil standarisasi MBJH dengan timokuinone

Determinasi BJH dilakukan di Lab. Biologi Farmasi UGM oleh tenaga ahli dengan sertifikat hasil uji terlampir. Hasil maserasi BJH dengan pelarut heksan yang dilanjutkan destilasi uap diperoleh minyak berwarna kuning bening

dengan viskositas agak encer dan bau khas minyak atsiri BJH. Minyak kasar (*cruded oil*) BJH yang dibeli dari penjual obat tradisional berwarna kuning tua-kecoklatan, dengan viskositas agak encer dan bau harum yang khas minyak atsiri BJH. Tabel I menyajikan hasil standarisasi kandungan MBJH dimana hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilaporkan oleh Nickavar *et al.* (2003).

Hasil pemeriksaan darah tepi

Tabel II menyajikan hasil pemeriksaan darah tepi dari hewan uji tikus SD yang diinduksi DMBA setelah mendapatkan MBJH. Rata-rata kadar Hb dan Hmt kelompok perlakuan MBJH berbagai dosis

Tabel I. Kandungan timokuinon dan asam lemak ekstrak dan MBJH yang ditetapkan dengan TLC untuk timokuinon dan GCMS untuk minyak lemak tak jenuh.

Jenis zat aktif BJH	Kandungan (%)
Timokuinon	2,72±0,02
Asam lemak	69,33±1,16
Asam kaproat	0,21±0,01
Asam kaprat	0,06±0,08
Asam laurat	0,04±0,05
Asam miristat	0,18±0,01
Palmitat	12,28±0,01
Palmitoleat	0,29±0,01
Stearat	79,98±0,02
Oleat	0,07±0,00
Linoleat	2,86±0,02

lebih tinggi dari rata-rata kadar Hb dan Hmt kelompok DMBA. Hasil penelitian membuktikan bahwa rata-rata kadar Hb dan Hmt kelompok DMBA ($6,60 \pm 2,07$ dan $24,80 \pm 0,45$) lebih rendah dari rata-rata kadar Hb dan Hmt kelompok normal ($14,67 \pm 0,52$ dan $43,33 \pm 2,73$) ($p < 0,05$), kelompok kontrol pelarut ($15,67 \pm 0,52$ dan $46,00 \pm 0,00$) ($p < 0,05$), kelompok timokuinon ($13,34 \pm 0,74$ dan $36,74 \pm 3,85$) ($p < 0,05$), kelompok tamoksifen ($13,83 \pm 2,99$ dan $41,17 \pm 8,70$) ($p < 0,05$).

Diantara kelompok perlakuan kadar Hb dan Hmt kelompok MBJH0,25 ($14,74 \pm 0,24$ dan $44,86 \pm 1,46$), MBJH2,5 ($14,44 \pm 0,80$ dan $43,14 \pm 1,95$) dan MBJH5 ($14,59 \pm 0,85$ dan $43,50 \pm 2,07$) lebih tinggi dari kadar Hb dan Hmt kelompok DMBA ($p < 0,05$). Kadar Hb dan Hmt kelompok MBJH tidak berbeda dengan kadar Hb dan Hmt kelompok normal ($p > 0,05$).

sedangkan kadar Hb dan Hmt kelompok timokuinon dan tamoksifen lebih rendah dari kadar Hb dan Hmt normal ($p < 0,05$).

Induksi DMBA juga berpengaruh terhadap penurunan kadar MCV dan MCH tikus SD. Dari pemeriksaan MCV dan MCH menunjukkan bahwa tikus SD kelompok DMBA cenderung mengalami anemia mikroskopik hipokromik. Rata – rata kadar MCV dan MCH kelompok DMBA lebih rendah ($54,40 \pm 1,52$ dan $16,33 \pm 0,52$) dari rata-rata kadar MCV dan MCH kelompok normal ($58,33 \pm 1,37$ dan $20,00 \pm 0,89$) ($p < 0,05$), kelompok kontrol pelarut ($56,67 \pm 1,37$ & $19,33 \pm 0,52$) ($p < 0,05$), timokuinon ($57,33 \pm 1,63$ & $21,17 \pm 1,21$) ($p < 0,05$), tamoksifen ($57,33 \pm 1,63$ & $19,67 \pm 0,52$) ($p < 0,05$). Diantara kelompok perlakuan, kadar MCV dan MCH kelompok MST6,8 ($56,86 \pm 0,89$ & $18,71 \pm 0,49$), MST68

Tabel II. Hasil Pemeriksaan darah tepi, jumlah lekosit, eritroit dan trombosit darah rutin tikus SD yang diinduksi DMBA pada minggu ke-21 percobaan.

Kelompok Uji	n	Jumlah lekosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$) (mean \pm SD)	Jumlah eritrosit ($\times 10^6/\mu\text{L}$) (mean \pm SD)	Jumlah trombosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$) (mean \pm SD)
Normal	6	$6,33 \pm 1,37^*$	$8,32 \pm 0,40^*$	$981,33 \pm 95,37^*$
MBJH0,25	7	$9,86 \pm 0,90^*$	$7,87 \pm 0,27^*$	$668,71 \pm 50,91^*$
MBJH2,5	7	$6,29 \pm 0,49^*$	$7,35 \pm 0,28^*$	$724,71 \pm 181,25^*$
MBJH5	8	$7,00 \pm 0,93^*$	$7,65 \pm 0,14^*$	$802,00 \pm 106,23^*$
Timokuinon	7	$6,86 \pm 0,90^*$	$6,53 \pm 0,94^*$	$734,29 \pm 151,14^*$
Tamoksifen	6	$7,00 \pm 2,68^*$	$6,59 \pm 0,21^*$	$889,17 \pm 387,24^*$
DMBA	5	$2,80 \pm 1,10$	$4,18 \pm 0,94$	$255,00 \pm 70,31$
Pelarut	6	$6,67 \pm 1,03^*$	$9,14 \pm 0,42^*$	$108,00 \pm 120,10^*$
Reference**		$7,67 \pm 1,62$	$8,20 \pm 0,55$	$836,00 \pm 132,00$

Nb: *= $p < 0.05$ terhadap kelompok DMBA; **= (Giknis, 2008)
SD=standar deviasi

($59,29 \pm 0,49$ & $19,29 \pm 0,49$) dan MST136 ($59,38 \pm 0,52$ & $19,38 \pm 0,52$) lebih tinggi dari kadar MCV dan MCH kelompok DMBA ($p < 0,05$). Dari hasil penelitian dibuktikan bahwa kelompok DMBA memiliki rata-rata kadar MCV dan MCH lebih rendah dari rata-rata MCV dan MCH darah kelompok normal ($p < 0,05$) maupun kelompok kontrol pelarut ($p > 0,05$). Dari hasil penelitian dibuktikan bahwa induksi DMBA menurunkan kadar Hb atau menyebabkan terjadinya anemia. Anemia akibat paparan DMBA cenderung bersifat mikrositik hipokromik yang dicirikan dengan penurunan kadar MCV dan MCH. Pemberian MBJH menghambat penurunan kadar Hb, Hmt, MCV dan MCH.

Hasil penelitian membuktikan bahwa induksi DMBA pada tikus SD betina menurunkan jumlah sel darah. Tabel 3 menyajikan hasil penelitian gambaran darah tepi tikus SD, rata-rata jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit pada kelompok DMBA ($AL = 2,80 \pm 1,10$; $AE = 4,18 \pm 0,94$ dan $AT = 255,00 \pm 70,31$) lebih rendah dari kelompok normal ($AL = 6,33 \pm 1,37$; $AE = 8,32 \pm 0,40$ dan $AT = 981,33 \pm 95,37$) ($p < 0,05$) maupun kontrol pelarut ($AL = 6,67 \pm 1,03$; $AE = 9,14 \pm 0,42$ dan $AT = 1085,00 \pm 120,10$) ($p < 0,05$).

Hasil penelitian (Tabel II) membuktikan bahwa pemberian MBJH, timokuinon dan tamoksifen dua minggu sebelum dan lima

minggu selama induksi DMBA pada tikus SD betina menaikkan jumlah sel darah tepi. Rata-rata jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit kelompok yang diberi MBJH lebih tinggi dari jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Rata-rata jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit darah kelompok timokuinon lebih tinggi dari rata-rata jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Rata-rata jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit darah kelompok tamoksifen lebih tinggi dari rata-rata jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Dari hasil penelitian ini membuktikan bahwa induksi DMBA dapat menurunkan jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit pada tikus SD. Pemberian MBJH selama 2 minggu sebelum dan lima minggu selama diinduksi DMBA dapat menghambat penurunan jumlah lekosit, eritrosit dan trombosit.

Hasil penelitian pada Tabel III menunjukkan bahwa persentase hitung jenis lekosit kelompok normal berbeda bermakna dengan persentase hitung jenis lekosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Dari hasil penelitian dibuktikan bahwa rata-rata jumlah lekosit kelompok DMBA lebih rendah dari rata-rata jumlah lekosit kelompok normal ($p < 0,05$) maupun kontrol pelarut ($p < 0,05$). Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa induksi DMBA $10 \times 20 \text{ mg/kgBB}$ dapat menurunkan

Tabel III. Hasil Pemeriksaan jumlah lekosit darah rutin tikus SD yang diinduksi DMBA pada minggu ke-27

Kelompok Uji	n	Jumlah lekosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$) (mean \pm SD)	Rata-rata netrofil (mean \pm SD)	Rata-rata limfosit (mean \pm SD)	Rata-rata monosit (mean \pm SD)	Rata-rata eosinofil (mean \pm SD)
Normal	6	6,33 \pm 1,37*	30,67 \pm 4,23*	61,67 \pm 3,61*	6,33 \pm 0,52*	1,33 \pm 0,52
MHBJH0,25	7	9,86 \pm 0,90*	33,57 \pm 0,98*	53,71 \pm 1,80*	10,86 \pm 1,07*	1,86 \pm 1,07
MHBJH2,5	7	6,29 \pm 0,49*	27,14 \pm 3,63*	65,14 \pm 3,58*	6,14 \pm 0,89*	1,57 \pm 0,53
MHBJH5	8	7,00 \pm 0,93*	27,75 \pm 1,67*	65,13 \pm 0,83*	5,75 \pm 1,04*	1,38 \pm 0,52
Timokuinon	7	6,86 \pm 0,90*	28,14 \pm 1,68*	64,71 \pm 1,11*	5,71 \pm 0,95*	1,43 \pm 0,53
Tamoksifen	6	7,00 \pm 2,68*	35,53 \pm 8,64*	57,50 \pm 7,12*	5,67 \pm 1,86*	1,33 \pm 0,52
DMBA	5	2,80 \pm 1,10	50,80 \pm 5,54	44,40 \pm 2,51	3,20 \pm 1,64	1,60 \pm 1,52
Pelarut	6	6,67 \pm 1,03*	30,67 \pm 4,23*	61,67 \pm 3,72*	6,33 \pm 0,52*	1,33 \pm 0,52
Referensi**		7,67 \pm 1,62	19,3 \pm 8,5%	75,8 \pm 9,1%	2,3 \pm 0,7%	1,9 \pm 1,2%

Nb: *=p<0.05 terhadap kelompok DMBA; **=(Giknis, 2008)

SD= standar deviasi

jumlah lekosit pada tikus SD. Rata-rata jumlah lekosit kelompok MBJH0,25, MBJH2,5 dan MBJH5 lebih tinggi dari jumlah lekosit darah kelompok DMBA (p<0,05).

Rata-rata jumlah lekosit darah kelompok yang mendapatkan timokuinon dan tamoksifen lebih tinggi dari rata-rata jumlah lekosit darah kelompok yang diinduksi DMBA (p<0,05). Pemberian MBJH berbagai dosis dan timokinon 50 mg/kgBB serta tamoksifen selama 2 minggu sebelum dan lima minggu selama diinduksi DMBA terbukti menghambat penurunan jumlah lekosit pada tikus SD yang diinduksi DMBA.

Berdasarkan hasil uji yang disajikan pada Tabel III, jumlah netrofil mengalami kenaikan secara bermakna dari nilai normal yang ditunjukkan dalam literature (Giknis, 2008). Kelompok DMBA memiliki

persentase netrofil tertinggi, lebih tinggi dari kelompok normal maupun kontrol pelarut (p<0,05), kemudian diikuti oleh kelompok tamoksifen (p<0,05), kelompok MHBJH0,25 (p<0,05). Induksi DMBA pada tikus SD terbukti meningkatkan persentase neutrofil. Pemberian MBJH, timokuinon dan tamoksifen menurunkan persentase neutrofil pada tikus SD yang diinduksi DMBA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata jumlah limfosit dalam penelitian ini kurang dari nilai limfosit normal literature (Giknis, 2008). Induksi DMBA menurunkan jumlah limfosit, hasil penelitian membuktikan bahwa jumlah limfosit kelompok DMBA lebih rendah dari kelompok normal maupun kontrol pelarut (p<0,05). Pemberian MBJH dan timokuinon meningkatkan jumlah limfosit tikus SD yang

diinduksi DMBA, hasil penelitian membuktikan bahwa jumlah limfosit kelompok MJBH0,25, MJBH2,5, MJBH5 dan timokuinon lebih tinggi dari jumlah limfosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Jumlah limfosit kelompok tamoksifen lebih tinggi dari jumlah limfosit kelompok DMBA tetapi lebih rendah dari jumlah limfosit kelompok timokuinon ($p < 0,05$).

Dari hasil penelitian diketahui bahwa rata-rata jumlah monosit semua kelompok pada penelitian ini lebih tinggi dari nilai normal literature (Giknis, 2008). Induksi DMBA menurunkan jumlah monosit tikus SD, hasil penelitian membuktikan bahwa rata-rata jumlah monosit kelompok DMBA lebih rendah dari jumlah monosit kelompok normal maupun control pelarut ($p < 0,05$). Pemberian MST dan timokuinon meningkatkan persentase monosit tikus SD yang diinduksi DMBA. Persentase monosit MJBH0,25, MJBH2,5, MJBH5 dan timokuinon lebih tinggi dari persentase monosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Persentase monosit kelompok tamoksifen sama dengan persentase monosit kelompok timokuinon ($p > 0,05$) dan lebih tinggi dari persentase monosit kelompok DMBA ($p < 0,05$). Persentase monosit tertinggi terdapat pada kelompok MST6,8 lebih tinggi dari kelompok normal maupun kelompok yang mendapat timokuinon ($p < 0,05$).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase eosinofil kelompok uji cenderung lebih tinggi dari nilai normal literature (Giknis, 2008). Persentase eosinofil kelompok DMBA sama dengan persentase eosinofil kelompok normal, control pelarut, timokuinon, tamoksifen serta MJBH. Induksi DMBA pada tikus SD tidak berpengaruh terhadap persentase eosinofil. Diantara kelompok uji, kelompok MJBH0,25 memiliki rata-rata persentase eosinofil paling tinggi ($1,86 \pm 1,07$), tetapi tidak bermakna ($p > 0,05$). Hasil penelitian ini memperkuat penelitian sebelumnya tentang efek imunotoksik atau imunosupresif DMBA-DE terutama pada aktifitas sumsum tulang dan limpa (Gao *et al.*, 2005; 2007; 2008). Hasil penelitian ini juga memberikan bukti ilmiah bahwa kandungan MJBH bersifat imunomodulator melalui antihemaotoksik dan peningkatan aktifitas sumsum tulang sesuai dengan praktek empiris selama ini (El-Kadi *et al.*, 1986; Haq *et al.*, 1999).

Melalui reseptor AhR paparan DMBA secara langsung meningkatkan aktivitas gen *CYP1B1/1A1* sehingga produk enzim CYP1B1/1A1 ditingkatkan (Miyata *et al.*, 1999) melalui aktivasi factor transkripsi XRE dan secara tidak langsung juga meningkatkan aktivitas Nrf2 sehingga terjadi peningkatan produksi enzim GST melalui aktivasi *antioxidative*

responsive elemen (ARE) (Shimada et al., 2003; 2006; Arora et al., 2004; Pitot et al., 2001). Peningkatan jumlah DMBA-DE dalam tubuh seiring dengan peningkatan jumlah dan aktivitas CYP1B1/1A1 dan berkurangnya enzim GST, diikuti stress oksidatif dan *dna adduct* (stress genotoksik) yang menyebabkan terjadinya aktivasi dan mutasi pada p53 (Tullo et al., 2002; sehingga memungkinkan inisiasi karsinogenesis, pembentukan neoplasma dan jaringan kanker disatu sisi dan menekan system imun disisi lain (Gao et al., 2005; 2007; 2008; Page et al., 2003). Beberapa kandungan bahan alam yang banyak mengandung polifenol atau flavonoid yang terdapat pada sayur-mayur atau jamu bersifat antioksidan dan imunomodulator, mampu mencegah karsinogenesis dan efek imunotoksik dari metabolit xenobiotik polisiklik aromatic hidrokarbon (Jones, 2000; Surh et al., 1999; 2000; 2003; Singletary et al., 1998; 2003).

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa pemberian MBJH 7 minggu, dua minggu sebelum dan lima minggu selama induksi DMBA pada tikus SD diinduksi DMBA bersifat kemopreventif dan antihematotoksik. Efek kemopreventif MBJH 0,25 setara dengan 2,5 ml/kgBB.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S, 2004, *Cellular and Molecular Immunology*, Second Ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company
- Akrom, 2011, Pengaruh Pemberian Minyak Biji Jinten Hitam Terhadap Jumlah Limfosit T Sitolitik (Ctl) Pada Tikus Sd Yang Diinduksi Dmba (*Dimethylbenzantracene*), LPP UAD, Laporan Penelitian, Yogyakarta
- Akrom, Nurani, L.N., Hidayati, T., 2008, Kajian aktivitas imunomodulator agen kemopreventif isolate aktif ekstrak *N.sativa* pada kanker payudara akibat paparan DMBA pada tikus putih, *Laporan Penelitian*, LPP UAD, Yogyakarta
- Akrom, 2004, Efek ekstrak etanol HERBA MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L) Terhadap Respon Imun Seluler Mencit Galur SWISS Jantan Selama Diinfeksi *Plasmodium Berghei* : Studi imunomodular fitokimia, *Tesis*, Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta
- Akrom, Khoiri, N., Suhana, Y., Mustofa, 2007. Pengaruh pemberian ekstrak etanol biji Jinten hitam (*N.sativa* Lour) terhadap aktivitas fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit jantan galur Balb C secara *in vitro*, *Seminar Nasional Tanaman Obat dan obat tradisional*, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Badan Litbang Kesehatan, Departemen Kesehatan RI, Solo, 10-11 Juli 2007

- Akrom, Wijaya, A., Djannah, S.N., 2007, Effect of the ethanolic extract of *Nigella sativa* on phagocytosis activity of macrophage male swiss mice during infection of *Listeria monocytogenes*, *The 4th International Eijkman Conference*, Bali, 15-18 November 2007
- Al Ghamdi MS, 2001. *The antiinflammator, analgesic and antipyretic activity of Nigella sativa*, 55 : 379-382. Departemen of Pharmacology King Faisal University Collage of Medicine. www.elseiver.com. Desember 2002
- Arora, A, Siddiqui, I.A., Shukla, Y., 2004. Modulation of p53 in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin tumors by diallyl sulfide in Swiss albino mice, *Mol Cancer Ther.*,3(11):1459-66.
- Badary OA, Abd-Ellah MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM, 2007. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice, *Food Chem Toxicol*, 45(1):88-92
- Bajak, E.Z., 2005. Genotoxic stress: novel biomarkers and detection methods uncovering RNAs role in epigenetics of carcinogenesis, *Dissertation*, Karolinska University Press, Sweden
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- El-Kadi A, Kandil O. 1986, Effect of *Nigella sativa* (the black seed) on immunity. Proceeding of the 4th International Conference on Islamic Medicine, Kuwait. *Bull Islamic Med*; 4: 344-8.
- Farrah, K.M., 2001. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters
- Gao J, Lauer FT, Dunaway S, Burchiel SW., 2005. Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) induced spleen cell immunotoxicity. *Toxicol Sci*. 86(1):68-74
- Gao, J., Lauer, F.T., Mitchell, L.A., Burchiel, S.W., 2007. Microsomal epoxide hydrolase is required for 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced immunotoxicity in mice. *Toxicol Sci*. 98(1):137-44
- Gao, J., Mitchell, L.A., Lauer, F.T., Burchiel, S.W., 2008. p53 and ATM /ATR Regulate 7,12-Dimethylbenz[a] anthracene - Induced Immunosuppression, *Mol Pharmacol*. 73: 1
- Gibbs, J.B., 2000, Mechanism-based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research, *Science* vol 287, 1969-1973
- Giknis, M.L.A., and Clifford, C.B., 2008. *Clinical laboratory parameters for Crl:WI (Han) Sprague Dawley Rat*, Charles River Laboratory, Montreal, Quebec, Canada
- Harborne J.B., 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Imam Sudiro, Edisi kedua, Penerbit ITB, Bandung.

- Haq, A., Lobo, P.I., Al Tufail, M., Rama, N., R., Al Sedairy, S., T., 1999. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography, *Int. J. Immunopharmacol.*, 21(4):283-95
- Hidayati, T., Akrom, 2006. Pengaruh ekstrak etanol jinten hitam terhadap aktivitas fagositosis makrofag mencit Swiss yang diinfeksi *P.berghei* secara in vitro, *Prosiding seminar nasional farmakoterapi*, Program Profesi Apoteker Fakultas Farmasi UAD, Yogyakarta: 14 Januari 2006
- Hodgson E., 2001. In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I: pesticides and related chemicals used in agriculture and public health, September 2001., *J Biochem Mol Toxicol.*, 15(6), 296-299
- Jones, CLA.,2000. Herbal Aids For Cancer. *Nutrition Science News* dalam *Chiro.org.* www.Chiro.org.
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd edition, Pearson Education Ltd., London
- Kresno, S.B., 2001. *Imunologi : Dignosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. Keempat. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova M. and Cermakova M., 2002, Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar Han Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.*, 51,633-640
- Meiyanto,E.,Susilowati,Sitarina,Arifin,I., 2004a, Efek Antimutagenik ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada kanker payudara tikus terinduksi DMBA melalui induksi enzim GST hepar dalam *Seminar "Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia"* Yogyakarta.
- Meiyanto, E., Sugiyanto, and R. Murwanti, 2004b. Efek Anti Karsinogenesis Ekstrak Etanol Tanaman Daun Dewa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr) pada Kanker Payudara Tikus yang diinduksi dengan Dimetilbenz(a)antrazena (DMBA). *Penelitian Hibah Bersaing*, 6-12
- Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M., 2000. Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures, *Chem Res Toxicol.*, 13(1),10-17
- Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M., 1999. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites, *Carcinogenesis*. 20(10),1885-1891
- Miyata, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., 1999, Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene, *J. Biol. Chem.*, 274, 23963-23968.
- Nickavar B., Mojab, F., Javidnia, K., Amoli, M.,A., 2003. Chemical composition of the fixed and

- volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran, *J. Naturforsch*, 58(9-10):629-31
- Page, T.J., O'Brien, S., Holstone, K., William, P.S., Jefcoat, C.R., 2003. 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-Induced Bone Marrow Toxicity Is p53-Dependent, *Toxicol Sci*. 74:85-92
- Pitot, H.C., and Dragan, Y., P., 2001, *Chemical Carcinogenesis*, in Curtis D Klaasen, Casarett & Doull's: *Toxicology, The Basic Science of Poisons*, 6th ed, Mc. Graw Hill. Medical Publishing Division, New York, p. 241-280.
- Purnomosari, D., Paramita, D.K., Aryandono, T., Pals, G., Van Diest, P.J., 2005. A novel BRCA2 mutation in an Indonesian family found with a new, rapid, and sensitive mutation detection method based on pooled denaturing gradient gel electrophoresis and targeted sequencing, *J.Clin.Pathol*, 58, 493-499
- Randhawa, M.A., Al-Ghamdi, MS., 2002, A review of the pharmacotherapeutic effects of *Nigella sativa*, *Pakistan J. Med. Res.* Vol.41, No.2
- Roitt, I., 2006, *Roitt's Essential Immunologi*, Ninth Edition, Blackwell Science Ltd, London, 380-385
- Sangat, H.M., Zuhud, E.A.M. dan Damayanti, E.K. 2000. *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic – metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon, *Drug. Metab Pharmacocinet*, 27(4), 257-276
- Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E.M.J., Guengerich, P., Inoue, K., 2001, Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon and other carcinogen by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in salmonella typhimurium NM2009, *Drug Metabolism and Disposition*, 29 (9), 1176-1181
- Singletary K, MacDonald C, Iovinelli M, Fisher C, Wallig M. 1998. Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, 19(6), 1039-1043.
- Singletary KW, Stansbury MJ, Giusti M, Van Breemen RB, Wallig M, Rimando A, 2003. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents, *J Agric Food Chem*; 3;51(25), 7280-7286.
- Surh, Y., 1999, Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, *Mut Res*, 428, 305-327
- Surh, Y., 2002, Anti-tumor promoting potential of selected of spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities : a short review, *Food and Chem. Tox.* 40, 1091-1097
- Surh, Y., 2003. Cancer Chemoprevention With Dietary

- Phytochemicals. *Nature Revs.*3. ; 768-80
- Tjindarbumi,D, dan Mangunkusumo,R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol* ; 32 (Supplement 1) ,17-21
- Tullo, A., and E. Sbisa. 2002. Molecular characterization of p53 mutations in primary and secondary liver tumors. Diagnostic and Therapeutic perspectives. *Molecular Biotechnology*, 21, 265-278.